

盐酸吡硫醇脂质体在大鼠体内药动学研究

李金卓¹, 潘磊², 冯佳², 唐星², 金向群^{1*}

1. 吉林大学, 吉林 长春 130021

2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 研究盐酸吡硫醇脂质体注射液在大鼠体内的药动学行为, 并与盐酸吡硫醇注射液进行比较, 评价盐酸吡硫醇脂质体药动学特征。**方法** 采用大鼠股静脉给药, 眼眶取血, UPLC/MS/MS 法测定大鼠血浆中盐酸吡硫醇的浓度, 运用 Masslynx™ NT4.1 软件进行数据采集; 运用 QuanLynx™ program 进行数据分析。**结果** 脂质体及溶液剂的 AUC_{0-4} 分别为 (1817.093 ± 197.832) 、 $(2592.349 \pm 303.194) \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$; $C_{\max}$ 分别为 (6080.502 ± 549.12) 、 $(9525.987 \pm 531.813) \mu\text{g}/\text{L}$; $t_{1/2}$ 分别 (1.512 ± 0.387) 、 $(0.732 \pm 0.388) \text{h}$ 。两制剂的药时过程均符合三隔室模型, 两者药动学行为相似。**结论** 运用 DAS2.0 进行生物等效性评价, 脂质体组与溶液剂组药动学参数均在等效置信区间内, 两制剂生物等效。

关键词: 盐酸吡硫醇; 盐酸吡硫醇脂质体; 药动学

中图分类号: R969.1; R971

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)05-0700-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.05.011

Pharmacokinetics of pyritinol hydrochloride liposomes in rats

LI Jin-zhuo¹, PAN Lei², FENG Jia², TANG Xing², JIN Xiang-qun¹

1. Jilin University, Changchun 130021, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To study on the pharmacokinetic behavior *in vivo* of pyritinol hydrochloride (Py-Hy) liposomes injection in rats and compare with the Py-Hy solution to evaluate pharmacokinetic characteristics of the Py-Hy liposomes. **Methods** Using femoral vein of rats, taking eyes blood, using UPLC/MS/MS to determinate plasma concentration of pyritinol hydrochloride in rat, using Masslynx™ NT4.1 software for data collection. Using Quan Lynx™ program for data analysis. **Results** AUC_{0-4} of liposomes and solution agent are (1817.093 ± 197.832) and $(2592.349 \pm 303.194) \mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, $C_{\max}$ were (6080.502 ± 549.12) and $(9525.987 \pm 531.813) \mu\text{g}/\text{L}$, $t_{1/2}$ were (1.512 ± 0.387) and $(0.732 \pm 0.388) \text{h}$, respectively. The medicine processes of the two preparations was in line with the three compartment model, and the pharmacokinetic behavior of the two preparations was similar. **Conclusion** The bioequivalence is evaluated by DAS2.0, the pharmacokinetic parameters of liposomes and solution agent group is in equivalent within the confidence interval, and the two preparations is biological equivalent.

Key words: pyritinol hydrochloride; pyritinol hydrochloride liposomes; pharmacokinetics

盐酸吡硫醇化学名为 3,3-(二硫代亚甲基)双(5-羟基-6-甲基-吡啶甲烷)二盐酸盐水合物, 其基本化学结构为两分子维生素 B₆ 以双硫键相连。本品为白色或类白色结晶性粉末, 无臭, 味苦涩。在水中易溶, 在乙醇中略溶, 在丙酮、三氯甲烷或乙醚中不溶。临床验证, 其既无维生素 B₆ 的作用, 又无抗维生素 B₆ 的作用, 但是在神经精神疾病的治疗中已显示出价值。它能促进脑内葡萄糖及氨基酸代谢, 改善全身同化作用, 增加颈动脉血流量, 增强脑功能,

对边缘系统及网状结构亦有刺激作用^[1]。为了降低其刺激性, 本研究采用乙醇注入超声法^[2]研制了盐酸吡硫醇脂质体, 通过大鼠股静脉给药研究该脂质体在大鼠体内的药动学特征, 为临床研究和新药设计提供了理论基础。

1 仪器与材料

ACQUITY™ UPLC 系统、Waters ACQUITY™ TQD UPLC/MS/MS (Waters 公司); AR1140 型电子分析天平 (上海民侨精密科学仪器有限公司); YKH—II

收稿日期: 2013-07-03

作者简介: 李金卓 (1988—), 女, 药物化学专业, 研究方向为新药开发及药物新剂型。Tel: (024)23986343 E-mail: 898207064@qq.com

*通信作者 金向群, 教授, 研究方向为新药开发及药物新剂型。E-mail: jinxq@jlu.edu.cn

型涡旋混合器(江西医疗器械厂); GL-20B 冷冻离心机(上海菲恰尔分析仪器有限公司)。

盐酸吡硫醇脂质体(2 mg/mL, 批号 20120421, 自制); 盐酸吡硫醇生理盐水溶液(2 mg/mL, 自制); 盐酸吡硫醇原料药(质量分数 99.6%, 上海新亚药业有限公司); 延胡索乙素(质量分数 99.9%, 批号 110726-201008, 中国食品药品检定研究院); 肝素钠(批号 H12020505, 天津市生物化学制药厂); 甲酸(北京化工厂); 纯化水(Barnstead EASYpure® IIRF/UV 超纯水系统纯化); 乙醚、乙腈、甲醇等均为分析纯或色谱纯。

SD 雄性大鼠, 体质量(200±20) g, 沈阳药科大学试验动物中心提供, 许可证号: SYXK(辽)2011-0001。

2 实验方法

2.1 色谱条件与质谱条件

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 40 °C; 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 0~0.8 min 90%A, 0.8~2.3 min 50%A, 2.3~3.0 min 90%A; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量 5 μL; 进样模式为部分进样。

2.1.2 质谱条件 电喷雾电离(ESI)接口; ESI 源正离子电离方式; 毛细管电压 3.0 kV; 锥孔电压 45 V; 二级锥孔和离子桥电压分别为 3.0、0.1 V; 源温和去溶剂化温度分别为 100、400 °C; 脱溶剂气(氮气)流速 500 L/h; 锥孔气(氮气)流速 50 L/h; 碰撞气(氩气)流速 0.2 mL/min; 扫描方式为多重反应监测模式(MRM)。

2.2 对照品及内标溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取盐酸吡硫醇 100 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用水溶解配制成 1 mg/mL 储备液。精密量取储备液适量, 用甲醇稀释成 0.010、0.025、0.050、0.100、0.250、0.500、1.000、2.500、5.000、25.000、50.000 μg/mL 盐酸吡硫醇系列标准溶液, 4 °C 冷藏保存备用。

2.2.2 内标溶液的配制 精密称取延胡索乙素 14 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释配制成 140 μg/mL 储备液, 摇匀, 精密量取上述溶液适量, 用甲醇稀释成 1.4 μg/mL 延胡索乙素溶液, 4 °C 冷藏保存备用。

2.3 血浆样品的处理

取血浆样品 100 μL 于 1.5 mL 离心管中, 加入

20 μL 内标溶液, 涡旋 1 min, 混匀, 加入甲醇 200 μL, 涡旋震荡 10 min, 12 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液进行测定。

2.4 方法专属性考察

取空白大鼠血浆, 除不加内标外, 其他均按照“2.3”项下操作处理, 进样 5 μL, 得 MRM 色谱图(图 1-A); 将一定浓度的盐酸吡硫醇对照品溶液和内标溶液加入到 100 μL 空白大鼠血浆中, 进样 5 μL, 得 MRM 色谱图(图 1-B); 取给药后的大鼠血浆样品进样 5 μL, 得 MRM 色谱图(图 1-C)。可见, 盐酸吡硫醇及内标延胡索乙素的峰形良好, 血浆中内源性物质对测定无干扰。

2.5 标准曲线与线性范围

向 100 μL 大鼠空白血浆(空白血浆取自未给过药的大鼠)中分别加入 20 μL 盐酸吡硫醇标准系列溶液与 20 μL 延胡索乙素内标溶液 20 μL, 配制成 0.002、0.005、0.010、0.020、0.050、0.100、0.200、0.500、1.000、5.000、10.000 μg/mL 的模拟血浆样品。按“2.3”项下操作测定, 以盐酸吡硫醇与内标峰面积比为纵坐标, 以浓度为横坐标, 采用加权最小二乘法进行线性回归, 得回归方程: $A=0.010\ 450\ 2\ C+0.077\ 818\ 4$ ($r=0.995\ 656$), 结果表明盐酸吡硫醇在血浆 0.002~10.000 ng/mL 呈良好的线性关系。

2.6 定量下限

取大鼠空白血浆 100 μL, 加入 10 μg/mL 盐酸吡硫醇对照品溶液 0.02 μL, 配制成相当于 2 ng/mL 盐酸吡硫醇血浆的模拟血浆样品, 在进行方法学确证实验的第一天进行 6 样本分析, 并根据当日回归方程计算每一样本的实际浓度, 分别为 2.305、2.115、1.625、2.239、2.076、2.151 ng/mL。由定量下限的准确度和精密度数据可知, 所建立的 UPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中盐酸吡硫醇的定量下限可达 2 ng/mL。

2.7 准确度与精密度

取大鼠空白血浆 100 μL, 按“2.5”项下的方法, 配制低、中、高 3 个浓度(5、100、8 000 ng/mL)的质控样品, 每一个浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 根据当日回归方程, 求算质控样品浓度, 根据质控样品测定结果计算准确度和精密度(表 1)。

2.8 回收率试验

取大鼠空白血浆 100 μL, 按“2.5”项下的方法, 精密加入不同浓度的盐酸吡硫醇对照品溶液, 配制低、中、高 3 个浓度(5、100、8 000 ng/mL), 每

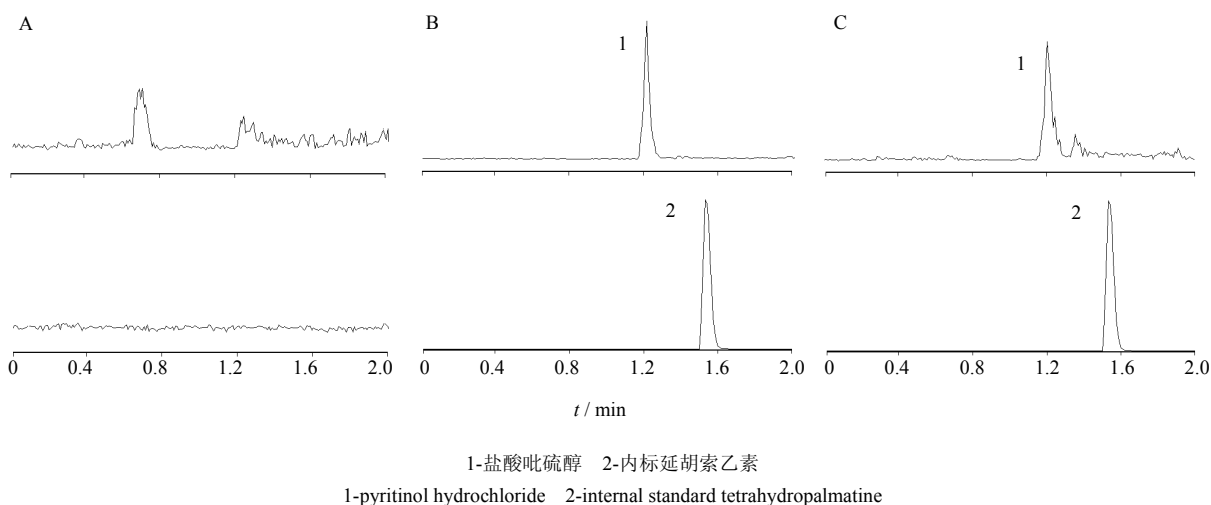


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆加入盐酸吡硫醇和内标延胡索乙素 (B)、单剂量股静脉注射盐酸吡硫醇脂质体后的血浆样品 (C) 的典型 MRM 色谱图

Fig. 1 Representative MRM chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with pyritinol hydrochloride and internal standard tetrahydropalmatine (B), and plasma from a rat after a single intravenous administration pyritinol hydrochloride (C)

一浓度进行 6 样本分析, 记录图谱, 得盐酸吡硫醇的峰面积。同时另取空白血浆各 100 μL , 除不加入内标溶液外, 按“2.3”项下操作, 向获得的上清液中加入相应浓度的盐酸吡硫醇对照品溶液 20 μL 和内标溶液 20 μL , 涡旋 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行测定, 记录图谱, 得到盐酸吡硫醇峰面积 (6 次测定的平均值)。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率 (表 2)。实验结果显示, 低、中、高 3 个浓度的回收率均大于 70%, 重现性好, 符合要求。

2.9 稳定性试验

取大鼠空白血浆 100 μL , 按“2.5”项下的方法制备低、高 2 个浓度质控样品 (每 1 个浓度 3 样本分析), 在进样室放置 6 h 后进行测定, 结果基本无变化, 表明处理后的盐酸吡硫醇溶液在进样室放置 6 h 内稳定。

2.10 给药方案与血浆样品采集

将 12 只体质量为 (200 $\pm$ 20) g 的雄性 SD 大

鼠随机分成参比试剂和受试试剂两组, 每组 6 只, 实验前 12 h 禁食。参比制剂组于右后股静脉注射自制盐酸吡硫醇注射液 (21 mg/kg), 受试制剂组于右后股静脉注射盐酸吡硫醇脂质体 (21 mg/kg)。分别于给药后 5、10、20、30、45、60、80、100、120、150、180、240、300、360、480 min 眼眶取血 0.5 mL, 置于预先肝素化的 1.5 mL 尖底离心管中, 6 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血浆于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 待测。

3 实验结果

取 100 μL 血浆样品, 按“2.3”项下方法操作, 以当天的回归方程计算各时间点血浆样品中盐酸吡硫醇的浓度。实验大鼠各时间点血药浓度的平均值与时间的关系曲线见图 2。

3.1 隔室模型药动学参数

采用 DAS2.0 统计计算软件 (中国药理学学会数学药理专业委员会) 药动学程序对盐酸吡硫醇脂质体和盐酸吡硫醇溶液型注射液的血药浓度数据进行

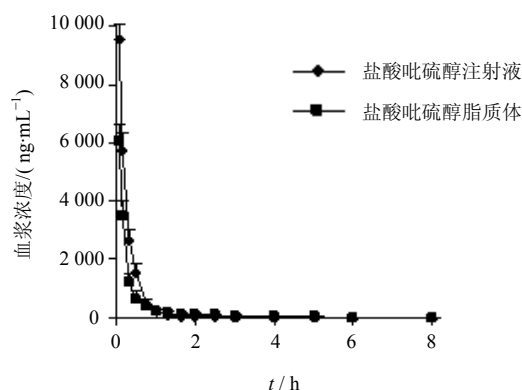
表 1 大鼠血浆中盐酸吡硫醇的日内精密度与日间精密度数据 ($n=6$)

Table 1 Intra-day and inter-day precision of pyritinol hydrochloride from rat plasma ($n=6$)

血药浓度/(ng·mL ⁻¹)	日内		日间	
	实测值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%	实测值/(ng·mL ⁻¹)	RSD/%
5	5.32 $\pm$ 0.04	11.83	5.067 $\pm$ 0.05	13.34
100	101.540 $\pm$ 1.02	8.18	102.799 $\pm$ 1.34	8.56
8 000	8 502.438 $\pm$ 3.20	8.97	8 782.521 $\pm$ 3.17	5.91

表 2 大鼠血浆中盐酸吡硫醇的提取回收率 ($n=6$)Table 2 Absolute recovery of pyritinol hydrochloride from rat plasma ($n=6$)

血药浓度/(ng·mL ⁻¹)	实测值/(ng·mL ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
5	5.06±0.07	94.08±3.02	8.14
100	97.36±1.03	95.18±2.79	2.74
8 000	8 045.72±0.87	92.77±2.64	2.64

图 2 单剂量股静脉注射盐酸吡硫醇脂质体和溶液型注射液的平均血药浓度-时间曲线 ($n=6$)Fig. 2 Mean plasma concentration-time profiles after intravenous pyritinol hydrochloride liposomes and pyritinol hydrochloride solution to rats ($n=6$)

处理。根据 AIC 值和拟合度判断两者的隔室模型归属。盐酸吡硫醇脂质体和盐酸吡硫醇溶液型注射液的血药浓度数据均符合三隔室模型, 权重系数为 $1/C^2$ 。

3.2 非隔室模型药动学参数及生物等效性评价

采用统计矩计算血药浓度^[3]分析药物的体内过程属于一种非隔室模型的分析方法, 它不需要对药物设定专门的隔室。本实验利用 DAS 2.0 统计计算软件, 根据血药浓度-时间实测数据所描述的体内过程, 计算盐酸吡硫醇脂质体和盐酸吡硫醇溶液剂的统计矩药动学参数, 结果见表 3。

采用对数转换, 对 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 进行双向单侧 t 检验, 结果显示两制剂等效。

4 讨论

盐酸吡硫醇为维生素 B6 类似物, 文献报道静脉注射给药后在体内代谢迅速, 8~40 min 血药浓度达高峰。血药浓度低, 采用一般的测定方法很难测定。LC-MS/MS 法灵敏度高、准确度高、分析时

表 3 非隔室模型拟合盐酸吡硫醇脂质体与参比溶液剂的各项药动学参数

Table 3 Non-compartment model parameters of pyritinol hydrochloride liposomes and pyritinol hydrochloride solution after intravenous administration to rats

参数	盐酸吡硫醇脂质体	盐酸吡硫醇溶液
AUC_{0-t} (1 817.093±197.832) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$	(2 592.349±303.194) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$	
$AUC_{0-\infty}$ (1 863.341±222.979) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$	(2 595.494±307.416) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$	
C_{max}	(6 080.502±549.12) $\mu\text{g}/\text{L}$	(9 525.987±531.813) $\mu\text{g}/\text{L}$
t_{max}	0.083 h	0.083 h
$t_{1/2}$	(1.512±0.387) h	(0.732±0.388) h

间短, 因此, 本实验采用此法进行测定, 并参考文献^[4]的样品处理方法进行样品处理。

通过药时曲线可以观察到, 静脉注射盐酸吡硫醇脂质体和盐酸吡硫醇溶液型注射液后, 在给药初期脂质体制剂血药浓度较参比制剂低, 约 1 h 后两制剂血药浓度-时间曲线交叉, 其后脂质体制剂血药浓度稍高于参比制剂。这可能是由于脂质体制剂具有缓释作用, 盐酸吡硫醇溶液型注射剂和盐酸吡硫醇脂质体制剂的 $t_{1/2}$ 分别为 (0.732±0.388)、(1.512±0.387) h, 或者是因为脂质体中的药物在静脉注射进入大鼠体内后会在某个脏器截留, 稍后逐渐释放, 使血药浓度增加。

采用 DAS2.0 统计计算软件的生物等效性程序对盐酸吡硫醇脂质体和盐酸吡硫醇溶液型注射液药动学参数进行了评价。采用对数转换, 对 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 进行了双向单侧 t 检验, 结果显示两制剂等效。此结果也进一步证明了盐酸吡硫醇脂质体在降低溶液型注射液的刺激性的同时亦可保证其治疗效果。

参考文献

- [1] 张 健. 盐酸吡硫醇药理作用与临床应用 [J]. 中国热带医学, 2005, 5(2): 394-395, 400.
- [2] 冯 佳. 注射用盐酸吡硫醇脂质体的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2012.
- [3] 刘昌孝. 缓释制剂的药物动力学原理及其评价 [J]. 天津药学, 1999, 11(1): 1-3.
- [4] 孟凡娜. 盐酸吡硫醇无痛型冻干粉针和亚微乳剂的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.